



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : A61K 31/195, 31/13 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 85/ 02340 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Juni 1985 (06.06.85) |
| <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP84/00371</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 27. November 1984 (27.11.84)</p> <p>(31) Prioritätsaktenzeichen: P 33 43 141.8</p> <p>(32) Prioritätsdatum: 29. November 1983 (29.11.83)</p> <p>(33) Prioritätsland: DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: AMMON, Hermann, P., T. [DE/DE]; Im Kleckacker 30, D-7400 Tübingen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: KRAUS, Walter usw.; Kraus, Weisert & Partner, Irmgardstr. 15, D-8000 München 71 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> | <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p> | |
| <p>(54) Title: UTILIZATION OF CYSTEIN DERIVATIVES OR THE SALTS THEREOF TO ENHANCE INSULIN SECRETION OF THE ISLETS OF LANGERHANS OF THE PANCREAS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON CYSTEIN-DERIVATEN ODER DEREN SALZEN, ZUR STEIGERUNG DER INSULINSEKRETION DER LANGERHANS'SCHEN INSELN DER BAUCHSPEICHELDRÜSE</p> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> $\begin{array}{c} R_1-NH-CH-COO-R_2 \cdot X \\ \\ R_3-C-R_4 \\ \\ SH \end{array} \quad (I)$ </div> <p>(57) Abstract</p> <p>Utilization of cystein derivatives or the salts thereof having the formula (I) wherein R₁ is a hydrogen atom or an acetyl rest, R₂ is a hydrogen atom, a methyl rest or an acyl rest, R₃ is a hydrogen atom or a methyl rest, R₄ is a hydrogen atom or a methyl rest and X is a protonic acid, to enhance the glucose-induced insulin secretion of the islets of Langerhans of the pancreas.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verwendung von Cystein-Derivaten oder deren Salze der Formel (I), wobei R₁ ein Wasserstoffatom oder ein Acetylrest, R₂ ein Wasserstoffatom, ein Methyl-, oder Ethylrest, R₃ ein Wasserstoffatom oder ein Methylrest, R₄ ein Wasserstoffatom oder ein Methylrest, sowie X eine Protonensäure ist, zur Steigerung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln in der Bauchspeicheldrüse.</p> | | |

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| AT Österreich | FR Frankreich | ML Mali |
| AU Australien | GA Gabun | MR Mauritien |
| BB Barbados | GB Vereinigtes Königreich | MW Malawi |
| BE Belgien | HU Ungarn | NL Niederlande |
| BG Bulgarien | IT Italien | NO Norwegen |
| BR Brasilien | JP Japan | RO Rumänien |
| CF Zentrale Afrikanische Republik | KP Demokratische Volksrepublik Korea | SD Sudan |
| CG Kongo | KR Republik Korea | SE Schweden |
| CH Schweiz | LI Liechtenstein | SN Senegal |
| CM Kamerun | LK Sri Lanka | SU Soviet Union |
| DE Deutschland, Bundesrepublik | LU Luxemburg | TD Tschad |
| DK Dänemark | MC Monaco | TG Togo |
| FI Finnland | MG Madagaskar | US Vereinigte Staaten von Amerika |

Verwendung von Cystein-Derivaten oder deren Salzen,
zur Steigerung der Insulinsekretion der
Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse.

Der Diabetes (Zuckerkrankheit) kann in verschiedenen
Formen auftreten. Der sogenannte Jugend-Diabetes
(Diabetes I) ist gekennzeichnet durch das Unvermögen
der dafür an sich zuständigen Langerhans'schen
5 Inseln in der Bauchspeicheldrüse zu ausreichender
Produktion und Abgabe des für die Elimination von
Glucose aus dem Blut erforderlichen Insulins. Das
Insulin muß zugegeben werden. Solche Patienten sind
"insulinpflichtig". Anders verhält es sich bei dem
10 sogenannten Alters-Diabetes (Diabetes II): Er ist
gekennzeichnet durch das Unvermögen, das an sich in
den Zellen der Langerhans'schen Inseln vorhandene
Insulin an das Blut abzugeben. Solche Patienten
sind zwar nicht "insulinpflichtig". Ihre Behandlung
15 erfolgt durch Diät und ferner durch Stoffe, die
die Insulinsekretion aktivieren. Hierfür bekannte
Wirkstoffe sind z.B. die Sulfonylharnstoffe. Sie
aktivieren die Insulinsekretion über einen speziellen
Mechanismus direkt und/oder zusammen mit Blut-
20 zuckeranstieg.

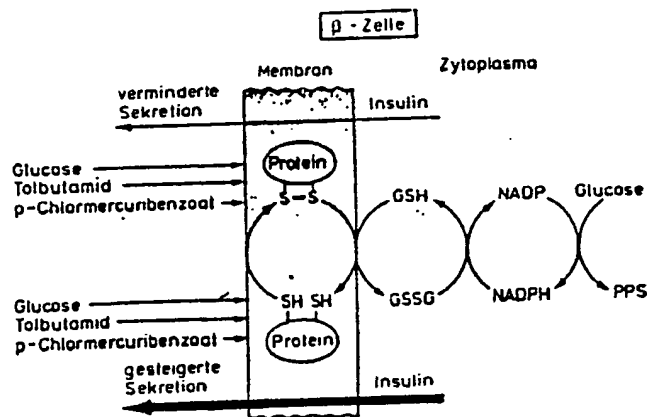
- 2 -.

Es ist bekannt, daß zwischen dem Thiolgehalt der Zellen der Langerhans'schen Inseln und der durch Glucose induzierten Insulinsekretion ein Zusammenhang besteht. Dabei ergab sich, daß das in den Langerhans'schen Inseln natürlich enthaltene Tripeptid Glutathion ein Redox-System bildet und daß eine Korrelation besteht zwischen dem Verhältnis von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) und der Konzentration an Glucose bei der induzierten Insulinsekretion (Ammon et al, Diabetes 29 (1980), No. 10 S. 830-834). Des weiteren spielt das Redox-Paar NADP/NADPH (Nikotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat), das als Wasserstoffüberträger dient, eine Rolle.

Es ist ferner bekannt, daß Agenzien, die NADPH und GSH oxidieren, die durch Glucose induzierte Insulinsekretion inhibieren (Ammon et al., Arch. Pharmacol. 207 (1979), S 91-96; Ammon et al., Endocrinology, Vol. 112, No. 2 (1983), 720-726).

Andererseits ergab eine Addition von GSH und Cystein in vitro eine Erhöhung der durch Glucose stimulierten Insulinsekretion

(Ammon et al, Arch. Pharmacol. 317 (1981), S 262-267). Weitergehende Untersuchungen haben gezeigt, daß durch die Hinzufügung von GSH und Cystein in vitro jedoch ohne eine für die Stimulanz genügend hohe Konzentration an Glucose keine Insulinsekretion herbeigeführt wurde. Aus all diesen Beobachtungen wurde das nachfolgend stilisiert dargestellte Modell über die Wirkung der erwähnten Redox-Paare postuliert. Es geht davon aus, daß die Permeabilität der β -Zelle einer Langerhans'schen Insel im Sinne verstärkter oder verminderter Insulinsekretion von dem Redoxzustand der Membran-SH-Gruppen abhängig ist.



Das Protein der Membrane ermöglicht bei reduziertem Zustand der SH-Gruppen eine gesteigerte Sekretion von

- 4 -

Insulin, während im oxidierten Zustand nur eine geringe Sekretion möglich ist. Diese Reduktion der Membran-S-S-Gruppen unter Wasserstoffübertragung kann durch das GSH unter Bildung von oxidiertem GSSG geschehen, das seinerseits wieder durch das Redox-Paar NADP/NADPH durch Wasserstoffübertragung in GSH übergeführt werden kann. Das durch diese Wasserstoffübertragung gebildete NADP kann wiederum durch Wasserstoffübertragung aus dem Glucose -PPS - (Pentosephosphatshunt) Weg in die reduzierte Form NADPH übergeführt werden.

Die Stimulation der gesteigerten Insulinsekretion führt also über folgenden Weg:

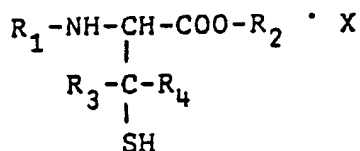
Glucose \longrightarrow PPS-Weg \longrightarrow NADPH \longrightarrow GSH \longrightarrow

reduzierte Membran-SH-Gruppen. Glucose steigert sowohl den Gehalt der Langerhans'schen Inseln an reduzierten Glutathion (GSH) als auch die Sekretion von Insulin, während die externe Zugabe von Insulin zur Abnahme des intrazellularen SH-Gehaltes und zur Hemmung der Sekretion von Insulin führt. Die externe Zufuhr von GSH potenziert die insulinfreisetzende Wirkung von Glucose, dagegen hatte GSH in Abwesenheit von Glucose keine Wirkung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, Stoffe anzugeben,

durch die die Insulinsekretion in Anwesenheit von Glucose angeregt wird. Unter Zugrundelegung des oben angegebenen Wirkungsmodells sind die Stoffe, die den internen Gehalt der β -Zelle an reduzierten Thiolgruppen erhöhen und somit die Funktion des GSH einzunehmen, in dem sie den Redox-Zustand der membranständigen SH-Gruppen der β -Zelle auf die reduzierte Seite hin verschieben.

Diese Aufgabe wird durch Cystein-Derivate oder deren Salze der Formel



gelöst. Sie wird ferner gelöst durch Cysteamin der Formel $NH_2-CH_2-CH_2-SH$. Bei diesen Substanzen ergibt sich bei Zugabe "in vitro" bei Anstieg der Glucosekonzentration über einem gewissen Schwellwert ein Anstieg der Insulinkonzentration. Als ein Maß für die Wirksamkeit kann der aus der Pharmakologie gebräuchliche Begriff der sogenannten "mittleren effektiven Dosis" ED_{50} in leicht abgewandelter Form benutzt werden. ED_{50} ist diejenige Menge an zugegebenem Thiol, gemessen in mM pro Reaktionslösung, die nötig ist, um zu 50 % der

11.0
2

- 6 -

maximal erreichbaren Zunahme an Insulin zu gelangen. Der ED_{50} -Wert ist also ein Maß für die erforderliche Dosis.

Auszugehen ist von einem ED_{50} -Wert der reduzierten Form des Glutathions (GSH) von 0,01. Von den erfindungsgemäßen Substanzen zeigen das Cystéamin mit einem ED_{50} -Wert von 0,01 und das N-Acetyl-L-Cystein (NAC) mit einem ED_{50} -Wert von 0,02 die besten Wirkungen. Daher sind diese Substanzen besonders vorteilhaft. Im einzelnen ergeben sich die ED_{50} -Werte für die einzelnen Substanzen aus der folgenden Tabelle:

Tabelle:

| Thiol | ~ ED ₅₀ -Wert |
|---|--------------------------|
| Glutathion (GSH) | 0,01 |
| Cysteamin NH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -SH | 0,01 |
| N-Acetyl-Cystein (NAC) | 0,02 |
| $ \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CO-NH-CH-COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $ | |
| D-Penicillamin $ \begin{array}{c} \text{NH}_2\text{-CH-COOH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-C-CH}_3 \\ \\ \text{SH} \end{array} $ | 0,2 |
| L-Cystein-methylester · HCL $ \begin{array}{c} \text{NH}_2\text{-CH-COOCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $ | 0,4 |
| L-Cystein-etyl ester · HCL $ \begin{array}{c} \text{NH}_2\text{-CH-COOC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $ | 0,5 |
| N-Acetyl-D-Penicillamin $ \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CO-NH-CH-COOH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-C-CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $ | 1,0 |

- 8 -

Bei N-Acetyl-L-Cystein und den anderen Cystein-derivaten handelt es sich um einen grundsätzlich anderen Wirkungsmechanismus, als bei den bekannten Sulfonylharnstoffen. Darin liegt zunächst an sich bereits ein Vorteil, da man bestrebt ist, eine bestimmte Krankheit auch durch Pharmaka mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen therapieren zu können. Das ermöglicht es, wenn ein Weg aus anderweitigen Gründen nicht begangen werden kann, auf einen weiteren Weg auszuweichen. Ein weiterer erheblicher Vorteil ist es, daß das N-Acetyl-L-Cystein und andere Cysteinderivate keine Eigenwirkung auf die Insulinsekretion ausüben, sondern nur dann eine Wirkung hervorrufen, wenn die Glucosekonzentration einen bestimmten Schwellwert überschritten hat. Es wirkt also als "Verstärker" bei Auftreten der im Normalfall die Insulinsekretion stimulierenden Bedingungen (Anwesenheit von Glucose). Es ist also nicht zu befürchten, daß eine Glucoseelimination aus dem Blut auch dann durch verstärkte Insulinsekretion herbeigeführt wird, wenn die Glucosekonzentration noch nicht über dem Normalwert liegt. Das bedeutet, daß keine hypoglykämischen Nebenwirkungen zu befürchten sind.

- 9 -

Im übrigen verstärken das N-Acetyl-L-Cystein bzw. Cysteinderivate die Wirkung des bekannten Sulfonylharnstoffes Tolbutamid. Beide Substanzen potenzieren sich gegenseitig. Das N-Acetyl-L-Cystein besteht aus zwei physiologischen leicht metabolisierbaren Grundbausteinen. Es ist also eine Substanz, von der kaum zu befürchten ist, daß sich unerwünschte Nebenwirkungen ergeben.

Die Applikation kann jeweils vor der Nahrungsaufnahme erfolgen; die Wirkung setzt erst mit der Nahrungsaufnahme, d.h. mit Anstieg der Glucosekonzentration im Blut ein und endet auch, wenn die Glucose auf den Normalwert zurückgegangen ist. Ferner ergibt sich, daß man hinsichtlich der Dosierung mit vernünftigen Mengen auskommt. Die Bereitschaft zur Wirksamkeit bleibt im Körper über einen gewissen Zeitraum unverändert erhalten; innerhalb dieses Zeitraumes, der mindestens 30 - 60 Minuten beträgt, kann Nahrungsaufnahme erfolgen, in deren Gefolge ein Anstieg der Glucosekonzentration auftritt, der dann durch die verstärkte Insulinsekretion, wie sie durch das N-Acetyl-Cystein angeregt wird, abgebaut wird.

- 10 -

Im Hinblick auf diese besonderen Eigenschaften wurde das N-Acetyl-L-Cystein auch in vivo untersucht. Das rechtfertigt den Schluß, daß bei den anderen Substanzen die "in vitro" gefundenen Eigenschaften ebenfalls "in vivo" anzutreffen sind. Es handelt sich bei dieser Gruppe von Substanzen generell um Stoffe, von denen man weiß, daß sie nicht spezies-spezifisch sind, so daß auf der Grundlage der im folgenden dargestellten Versuche auch die Wirkung beim Menschen anzunehmen ist.

Die Erfindung wird auch nicht dadurch nahegelegt, daß N-Acetyl-L-Cystein für eine andere Indikation bereits bekannt ist. Man verwendet es seither als schleimlösendes Mittel bei der Mucoviscidosis und als Leberschutzfaktor. Aus dieser Indikation läßt sich nicht schließen, daß es auch für den hier in Anspruch genommenen Zweck, nämlich die Stimulation der Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln der Bauspeicheldrüse, und damit zur Therapie von Diabetes II, wirksam ist.

Die Erfindung wird auch dann verwirklicht, wenn man die SH-Gruppe mit einer intracellulär abspaltbaren Schutzgruppe versieht.

Im folgenden sind einige Ausführungsbeispiele der Erfindung näher beschrieben. Es zeigen:

- 11 -

Figur 1 - 10 den Einfluß von verschiedenen
Thiolen auf die durch Glucose
induzierte Insulinsekretion
Langerhans'scher Inseln in vitro;

Figur 11 den Einfluß des N-Acetyl-L-
Cysteins auf die durch Glucose
induzierte Insulinsekretion in
vivo;

Figur 12 den Einfluß des N-Acetyl-L-
Cysteins bei zeitlicher Zugabe
vor der Glucose;

Figur 13 den zeitlichen Verlauf der Glucose-
konzentration, gemessen in mM/l,
im Plasma von Ratten, bei Zugabe von
N-Acetyl-L-Cystein.

In allen Diagrammen sind die statistischen Mittel-
werte der mehrfach durchgeführten (n) Versuche ein-
getragen. Zur statistischen Wertung wurde der so-
genannte "Student's t-Test" benutzt. Um vergleichende
Betrachtungen der einzelnen Meßergebnisse durch-
führen zu können, wurde die "mittlere, effektive Dosis"

- 12 -

ED₅₀ bestimmt, d.h., diejenige Dosis, die 50% des maximalen therapeutischen Effekts hervorruft. Das ist exakt diejenige Menge Thiol, die nötig ist, um 50% der maximalen Insulinsekretion zu erreichen.

Bei den in Figur 1 - 3 aufgezeigten Ausführungsbeispielen zeigt das N-Acetyl-Cystein (NAC) mit seinem ED₅₀-Wert von ungefähr 0,02 gegenüber den Ester-Hydrochloriden (Methylester 0,4, Ethylester 0,5) die beste Wirkung bezüglich der gesteigerten induzierten Insulinsekretion.

Die Tiere beiderlei Geschlechts wurden aus einer lokalen Zucht entnommen. Sie wogen ca. 300g und wurden mit einer Standard-Diät (Altromin) ernährt. Die Langerhans'schen Inseln wurden nach Lasy und Kostianovsky (Diabetes 16 (1967), S. 35-39) isoliert. Die Insulinbestimmung erfolgte nach Söldner und Slone (Diabetes 14 (1965) S. 771-779). Glucose und Thiol wurden dabei nahezu gleichzeitig verabreicht (Differenz 30 Sek.). Als Ordinate ist der Insulingehalt pro ml Untersuchungslösung pro 5 Langerhans'scher Inseln nach einer Zeit von 10 Minuten aufgetragen. Als Einheit der grafischen Darstellung dienen "Micro

- 13 -

Units of Immunoreactive Insulin" (1UIRI). Als Abszisse ist die Zugabe Thiol in mM pro Volumen Untersuchungslösung angegeben.

Die Figuren 1 - 3 zeigen den Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein (NAC), L-Cystein Methylester.HCl, sowie von L-Cystein-Ethylester.HCl auf eine von 11,1 mM glucoseinduzierte Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln von Ratten.

Figur 4 und 5 zeigt die Untersuchungsergebnisse zweier weiterer Cystein-Derivate nämlich das D-Penicillamin und das N-Acetyl-D-Penicillamin sowie unter Figur 6 das Cysteamin. In diesen Diagrammen zeigt die gestrichelt eingezeichnete Linie die Ergebnisse bei einer Glucosekonzentration von 2,8 mM, die ihrerseits die Sekretion von Insulin nicht stimuliert, und die durchgezogene Linie die Ergebnisse bei einer Glucosekonzentration von 11,1 mM. Die ED₅₀-Werte ergaben für das D-Penicillamin 0,2 für das N-Acetyl-D-Penicillamin 1,0 und für das Cysteamin den beachtlichen Wert von 0,01.

Die Interpretation der Untersuchungsergebnisse bei geringen Glucosekonzentrationen (2,8 mM gestrichelte Linie) sind dahingehend zu tätigen, daß unter

einer gewissen Schwellkonzentration an Glucose bei Zugabe von Cystein-Derivaten, deren Salze oder Cysteamin keine erhöhte Insulinsekretion erfolgt. Dies bedeutet, besonders in Hinsicht auf eine spätere pharmakologische Anwendung übersetzt, daß erst ein Übersteigen einer gewissen Blutzuckerkonzentration wie sie z.B. nach einer Nahrungsaufnahme erfolgt, die induzierte Insulinsekretion folgt.

Figur 7 bis 10 zeigen zur Abgrenzung die Untersuchungsergebnisse von cystein-ähnlichen Substanzen, die ebenfalls Thiolgruppen enthalten. Das Homocystein (vgl. Figur 7) unterscheidet sich vom Cystein nur durch den Einschub einer CH_2 -Gruppe; es ist also dem Cystein nahe verwandt, allerdings kein Derivat. Bei ihm ergibt sich keine Einwirkung auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion.

Figur 10 zeigt die Wirkung des 2-Mercaptoäthansulfonatnatriumsalzes (Mesna) das sowohl eine Thiolgruppe als auch eine Sulfongruppe enthält, so daß aus diesem Grund eine insulinsekretionserfördernde Wirkung zu vermuten war. Eine solche wurde jedoch nicht beobachtet.

Figur 11 zeigt die Untersuchungsergebnisse für das des N-Acetyl-L-Cystein (ED_{50} 0,02) bei Versuchen "in vivo" an Ratten. Hier ist die Änderung des Plasmainsulingehaltes gemessen in "Micro Units pro ml" (μ U/ml) gegenüber der Zeit aufgetragen. Die gestrichelte Linie zeigt die Änderung des Plasmainsulins von Ratten, denen zum Zeitpunkt $t = 0$ 0,5g Glucose pro Kg Körpergewicht verabreicht wurde, diese gestrichelte Linie ist die Referenzkurve; sie zeigt das "normale" Verhalten von Ratten ohne zusätzliche Verabreichung von Thiolen.

In Figur 11 zeigen die durchgezogenen Linien den Verlauf bei Ratten, denen zum Zeitpunkt $t = 0$ eine Dosis von 0,05g Glucose pro Kg Körpergewicht (g/kg KG) verabreicht und 0,5 Minuten ($t = -0,5$) vor diesem Zeitpunkt 0,1 oder 0,05 oder 0,025 mM NAC/kg KG zusätzlich verabreicht wurden. In Zeitabständen von 5 Minuten ($t = 5, 10, 15, 20, 25, 30$ Min.) wurde an den Tieren das Plasmainsulin bestimmt. Der Kurvenverlauf zeigt eindeutig die durch NAC gesteigerte Insulinsekretion.

In Figur 12 werden nun Untersuchungen gezeigt, bei denen die Reaktionsbedingungen gegenüber den vorher gezeigten derart abgeändert sind, daß das NAC zeitlich vor der Glucose verabreicht wird. Die Glucose wird zum Zeitpunkt $t = 0$ in der Dosierung $0,1 \text{ mM/kg KG}$ gegeben. Das NAC wird jedoch 30 Min. vor der Glucose verabreicht ($t = -30 \text{ Min.}$). Es ist eindeutig, daß NAC allein keine stimulierende Wirkung auf die Insulinsekretion hat, sondern daß erst durch die Zugabe von Glucose der induzierte Mechanismus ins Rollen kommt. Aus dieser Kurve ist eine weitere besonders vorteilhafte erfindungsgemäße Auswirkung zu entnehmen: Vergleicht man nämlich den Gehalt an Plasmainsulin bei der Ratte, der N-Acetylcystein gegeben wurde, mit dem der Ratte ohne Zugabe, jeweils zum Zeitpunkt $t = 5$ mit dem in Figur 11 im selben Zeitpunkt bei Verabreichung von $0,1 \text{ mM NAC/kg KG}$, so stellt man fest, daß sich kein Unterschied ergibt ($\sim 160 \text{ µU}$). Das bedeutet, daß das NAC, auch noch, nachdem es bereits 30 Minuten im Körper der Ratte war, dieselbe Wirkung bezüglich der positiv gesteigerten Insulinsekretion hat wie das in Figur 11, das die Wirkung bei NAC nahezu gleichzeitiger (Differenz 30 Sek.) Zugabe der

- 17 -

Glucose zeigt. Daraus folgt: Das N-Acetyl-L-Cystein wird also in einem Zeitraum von mindestens 60 Minuten nicht in dem Maße eliminiert, daß seine oben beschriebene Wirkung nicht mehr vorhanden ist. Übersetzt in ein mögliches therapeutisches Konzept bedeutet dies, daß die Applikation eines Medikaments zur Bekämpfung des Diabetes II mit N-Acetyl-L-Cystein als Wirkstoff jeweils vor der Nahrungsaufnahme erfolgen kann, und seine pharmakologische Wirksamkeit bis zu dem dadurch bedingten Blutzuckeranstieg voll beibehält.

Figur 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der Änderung der Plasmaglukosekonzentration (mM pro Liter). Dabei zeigt die gestrichelte Linie wiederum die Werte der "Referenzratte", (keine Zugabe von N-Acetyl-L-Cystein) der zum Zeitpunkt $t = 0$ eine Dosis von 0,05g Glucose/kg KG verabreicht wurde. Die durchgezogene Linie zeigt den Verlauf bei einer "N-Acetyl-L-Cystein-Ratte" (Zugabe von NAC) der zum Zeitpunkt $t = -0,5$ zusätzlich 0,025 mM NAC/kg KG verabreicht wurde. Bei der "NAC-Ratte" ist durch den erhöhten Insulinausstoß der Plasmaglukosegehalt bereits zum Zeitpunkt $t = 5$ wesentlich geringer als bei der "Referenzratte". Der Glucosewert sinkt wesentlich schneller auf den "Normalwert".

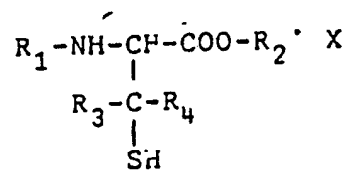
- 18 -

Dieser Wert wird jedoch nicht unterschritten. Dies bedeutet wiederum, wenn man es in ein mögliches therapeutisches Konzept übersetzt, daß der Blutzuckergehalt bei Nahrungsaufnahme nicht zu stark ansteigt und dann schnell auf seinen "Normalwert" abgesenkt wird. Dabei sinkt er nicht unter den "Normalwert" ab (keine "Unterzuckerung").

Der eingangs postulierte Wirkungsmechanismus, nämlich die direkte Einwirkung von Glucose und Thiol in die Reaktionsfolge erhält dadurch weitere Unterstützung. Die bisher verwendeten Medikamente bei der Bekämpfung der Diabetes II zeigen im Gegensatz dazu hypoglykämische Wirkungen. So konnten besonders durch altersbedingte Unaufmerksamkeiten bei nicht vorschriftsmäßiger Dosierung, insbesondere bei Überdosis, oft lebensbedrohende Zustände der Patienten eintreten. Nach der Erfindung steht jetzt ein Medikament ohne diese Gefahren für breite Anwendungsgebiete zur Verfügung.

Patentansprüche

1. Verwendung von Cystein-Derivaten oder deren Salze der Formel



wobei R_1 ein Wasserstoffatom oder ein Acetylrest, R_2 ein Wasserstoffatom, ein Methyl-, oder Ethylrest, R_3 ein Wasserstoffatom oder ein Methylrest, R_4 ein Wasserstoffatom oder ein Methylrest, sowie X eine Protonensäure ist, zur Steigerung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln in der Bauchspeicheldrüse.

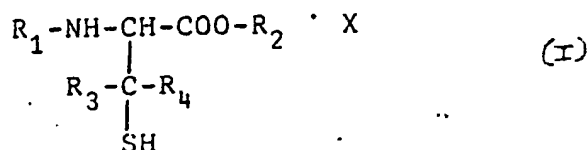
2. Cysteamin der Formel $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$ zur Steigerung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln in der Bauchspeicheldrüse.
3. Verwendung von Cystein-Derivaten oder deren Salze nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine der folgenden Substanzen handelt:
N-Acetyl-L-Cystein, L-Cystein-Methylester-HCl,
L-Cystein-Aethylester-HCl, D-Penicillamin, N-Acetyl-D-Penicillamin.
4. Verwendung von Cystein-Derivaten oder deren Salze :
und Cysteamin nach Anspruch 1 bzw. 2, dadurch gekennzeichnet, daß die SH-Gruppe mit einem intracellulär abspaltbaren Schutzrest versehen ist, nach dessen Abspaltung die freie SH-Gruppe vorliegt.

Titel: Verwendung von Cystein-Derivaten oder deren Salzen, zur Steigerung der Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse

(CR)

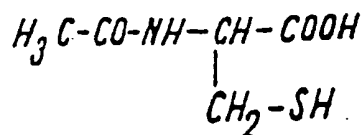
Z u s a m m e n f a s s u n g

Verwendung von Cystein-Derivaten oder deren Salze der Formel



wobei R_1 ein Wasserstoffatom oder ein Acetylrest, R_2 ein Wasserstoffatom, ein Methyl-, oder Ethylrest, R_3 ein Wasserstoffatom oder ein Methylrest, R_4 ein Wasserstoffatom oder ein Methylrest, sowie X eine Protonensäure ist, zur Steigerung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln in der Bauchspeicheldrüse.

(CR)



N-Acetyl-L-cystein

$ED_{50} \sim 0,02$

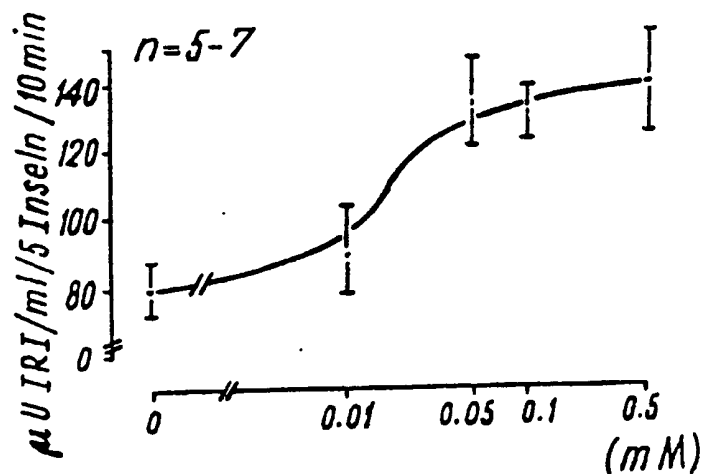
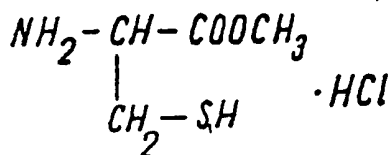


Fig. 1



L-Cystein-methylester-HCl

$ED_{50} \sim 0,4$

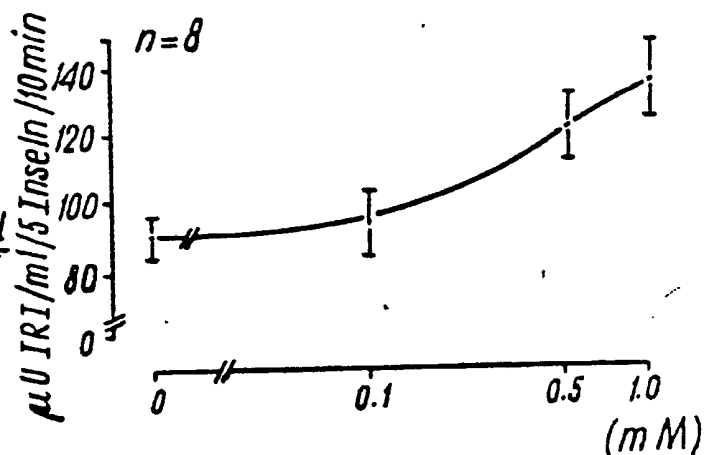
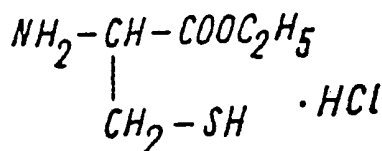


Fig. 2



L-Cystein-æthylester-HCl

$ED_{50} \sim 0,5$

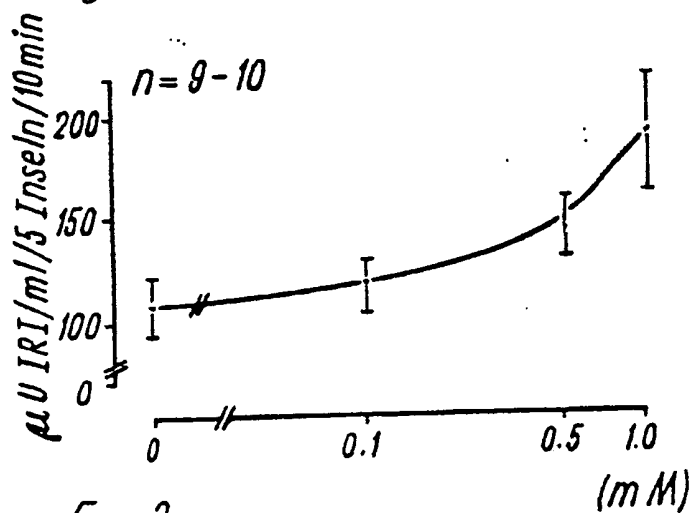


Fig. 3

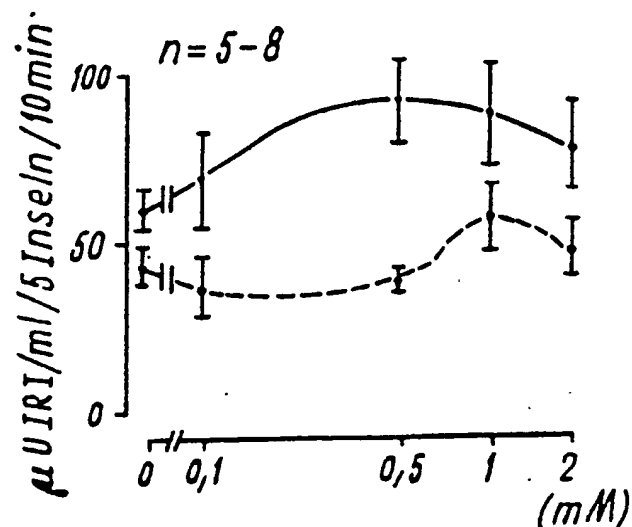
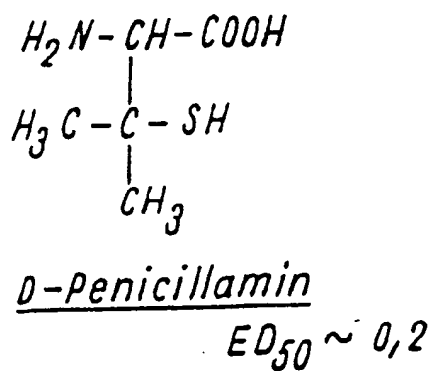


Fig. 4

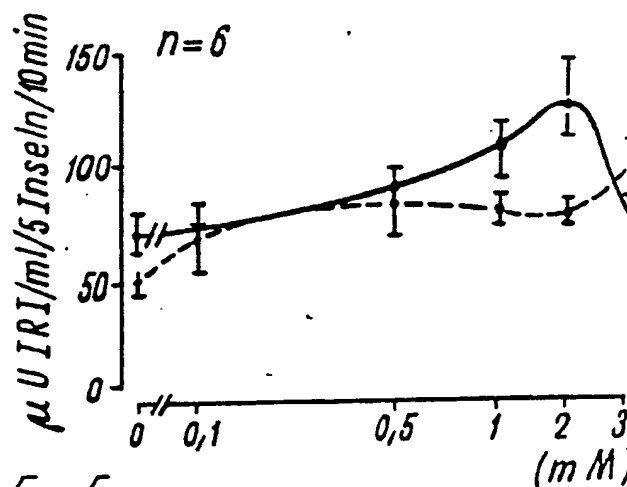
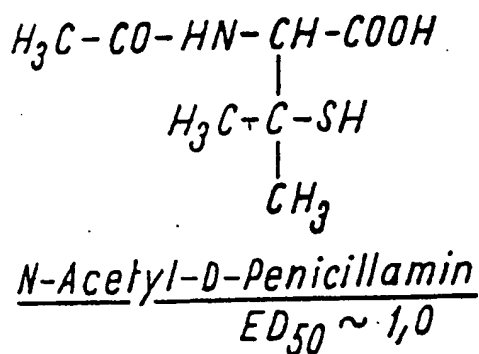


Fig. 5

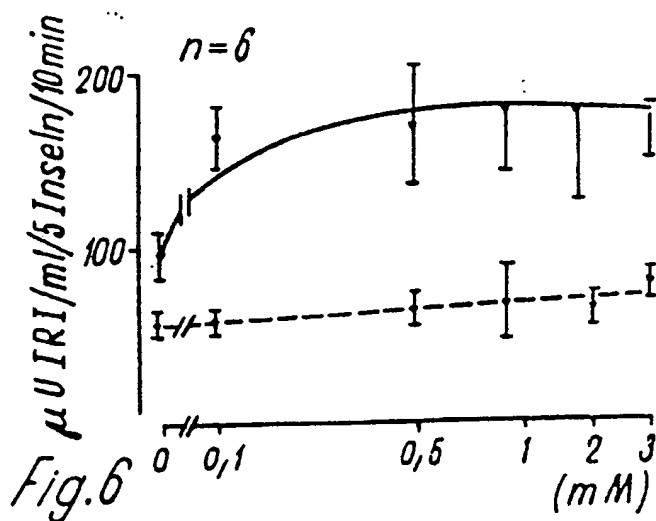
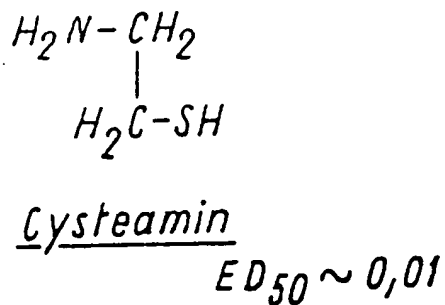


Fig. 6

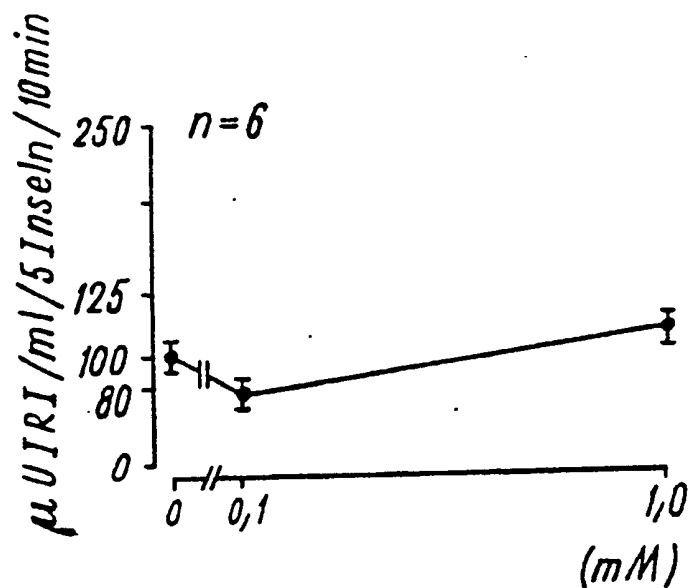
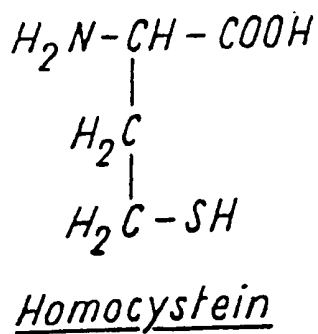


Fig.7

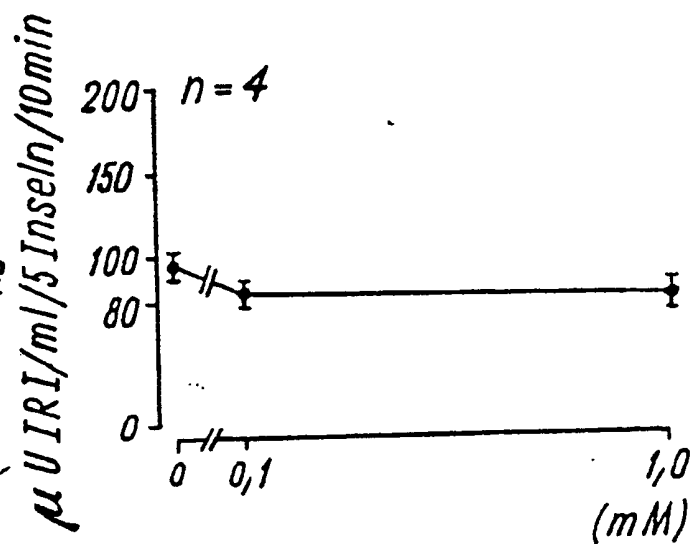
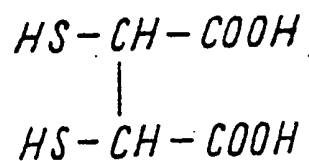
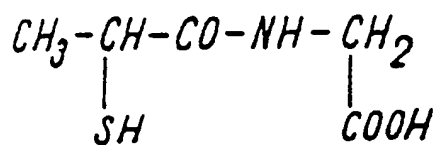


Fig.8



2-Mercaptopropionylglycin
(Thiola)

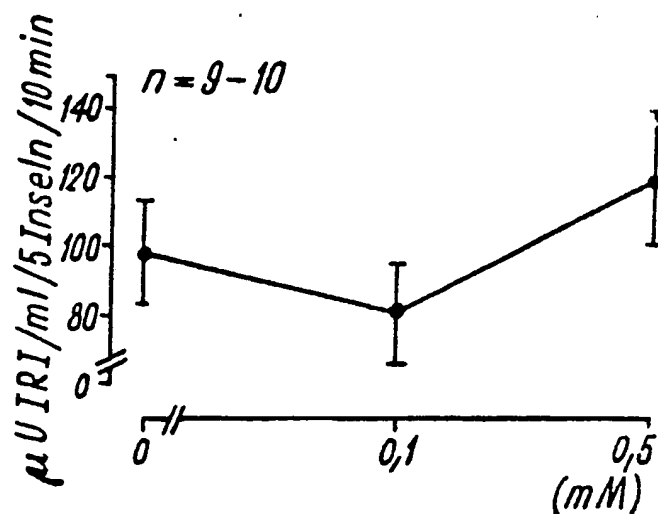
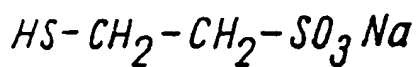


Fig.9



2-Mercaptoethansulfonat-Na
(Mesna)

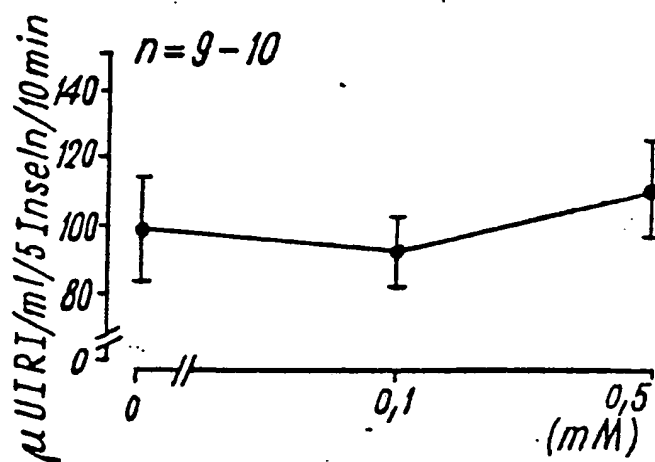


Fig.10

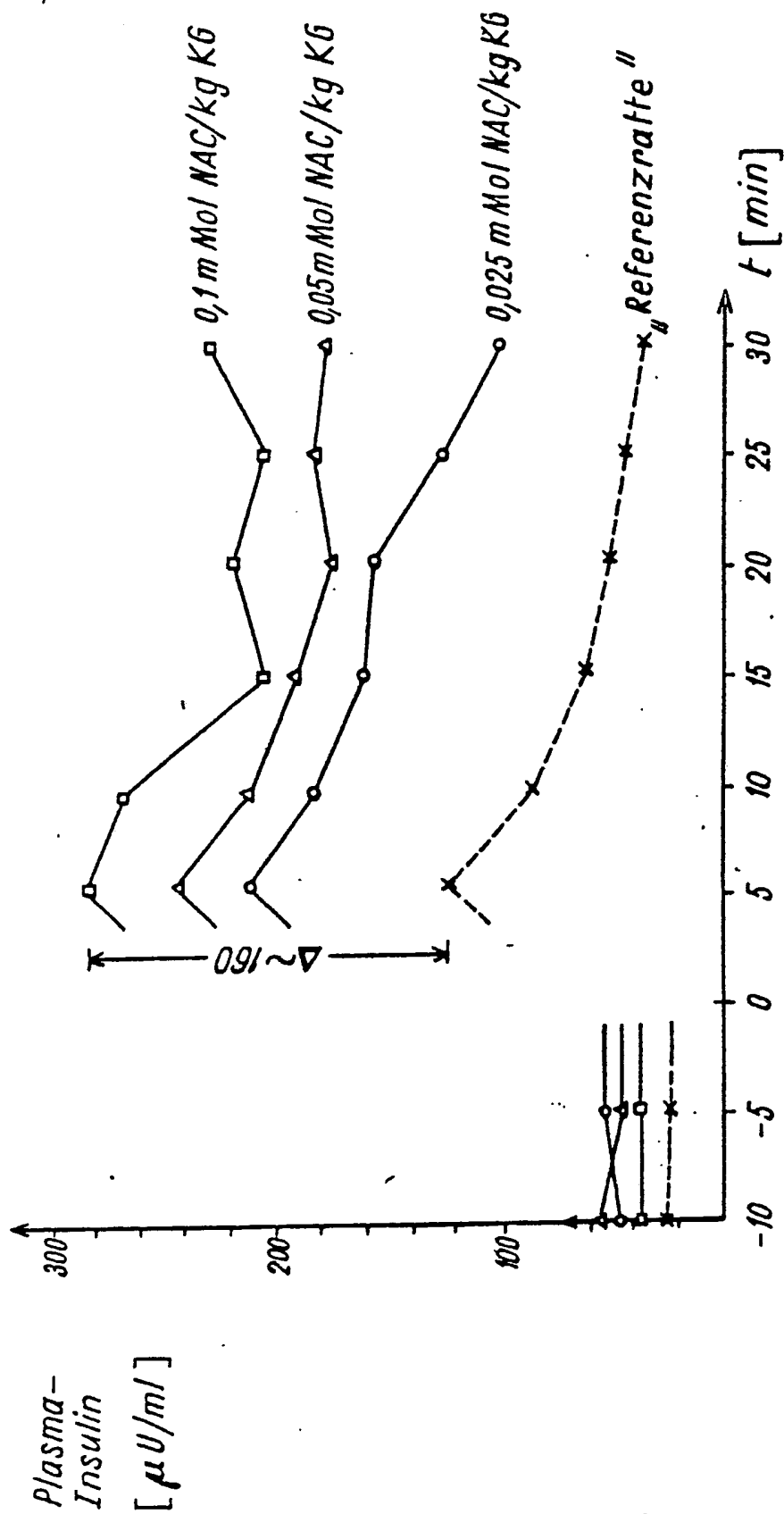


Fig.11

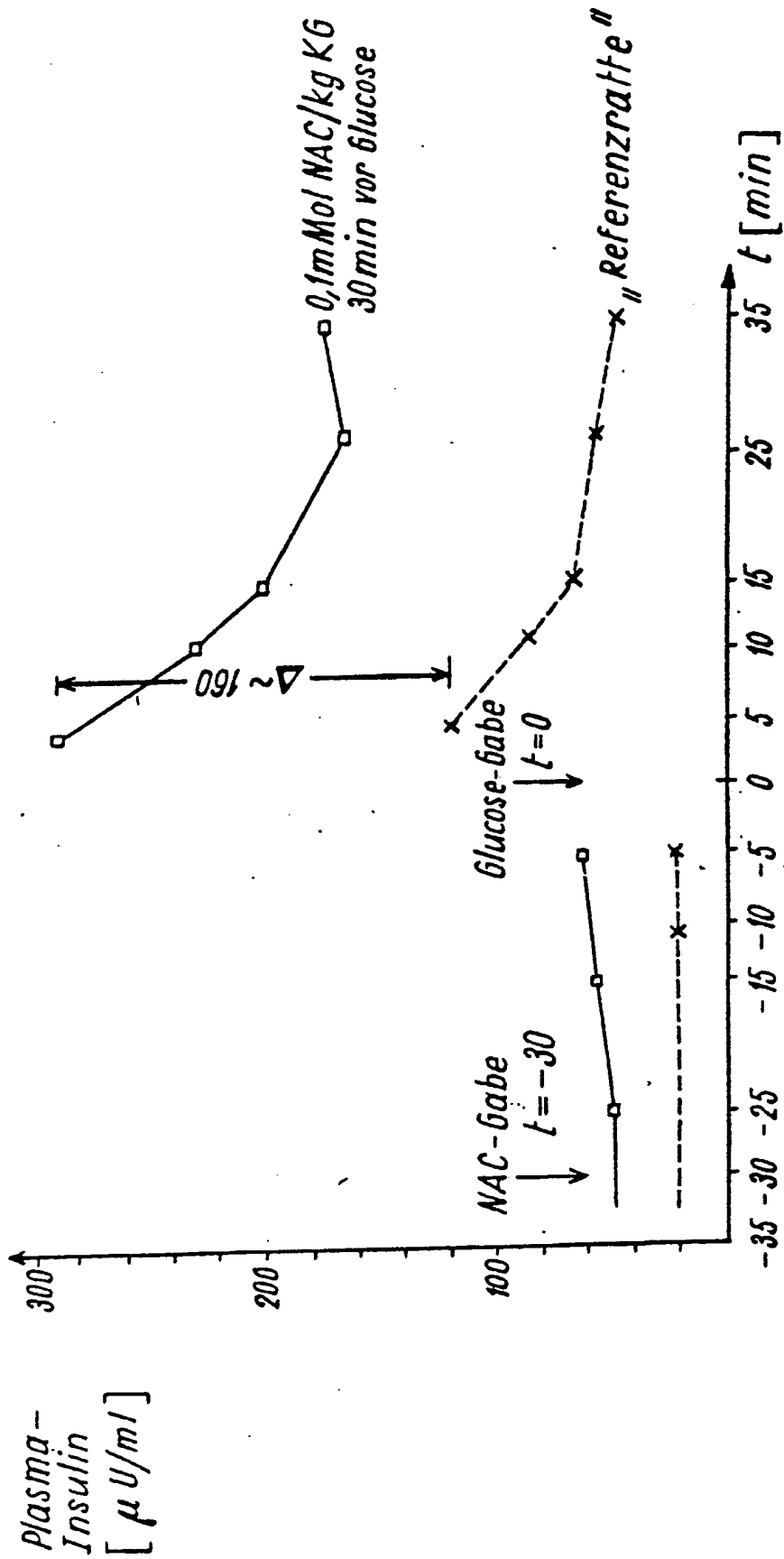


Fig.12

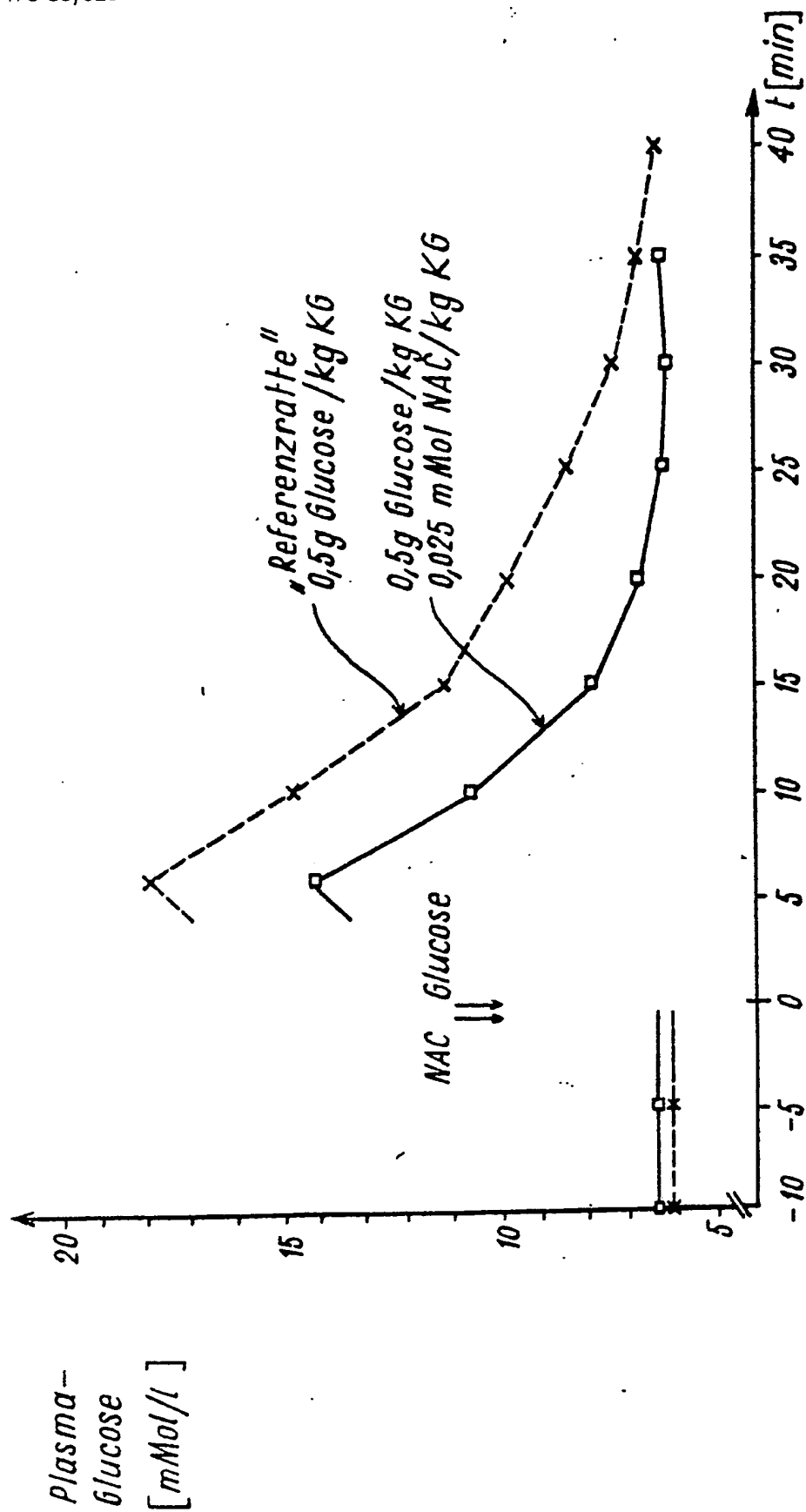


Fig. 13

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 84/00371

| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ³ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁴ A 61 K 31/195; A 61 K 31/13 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-------------------------------------|---|--|-------------------------------------|--------------------------|--|---|------------------------|---|-----|---|---|-----|---|--|---|---|--|---|
| II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Minimum Documentation Searched ⁴</div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 30%; border-bottom: 1px solid black;">Classification System</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px;">Int.Cl.⁴</td> <td style="padding: 5px;">A 61 K 31/00</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵</div> | | | Classification System | Classification Symbols | Int.Cl. ⁴ | A 61 K 31/00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Classification System | Classification Symbols | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Int.Cl. ⁴ | A 61 K 31/00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; border-bottom: 1px solid black;">Category [*]</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Citation of Document, ¹⁶ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷</th> <th style="width: 10%; border-bottom: 1px solid black;">Relevant to Claim No. ¹⁸</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstracts, vol. 71, no. 23, 8 December 1969, Columbus, Ohio (US) Chiba Takehisa: "Effect of sulfur-containing compounds on experimental diabetes.VI. Screening for hypo-glycemic action of sulfur-containing compounds", see page 200, abstract 111089w, Yakugaku Zasshi 1969, 89 (8), 1138-43 (Japan). & 8th Collective Index, vol. 66-75, 1967-1971 see pages 9455S and 32684S</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstracts, vol. 99, no. 25, 19 December 1983, Columbus, Ohio (US) Kawai Koichi: "Effect of cysteamine on canine splanchnic D cells", see page 154, abstract 206966x, Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1983, 59(7) 962-72 (Japan).</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstract, vol. 96, no. 7, 15 February 1982, Columbus, Ohio (US) H.P.T Ammon et al.: "Potentiation of the insulin-releasing capacity of tolbutamide by thiols: studies on the isolated perfused pancreas", see page 45, abstract 46096w, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1981, 317 (3) 262-7 (Eng.)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">DE, A, 2835000 (SAARSTICKSTOFF-FATOL GmbH) 21 February 1980, see claim 1</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Unlisted Drugs, vol. 24, no. 5, May 1972, Chatham (N.J.) (US) see page 68:b</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category [*] | Citation of Document, ¹⁶ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷ | Relevant to Claim No. ¹⁸ | X | Chemical Abstracts, vol. 71, no. 23, 8 December 1969, Columbus, Ohio (US) Chiba Takehisa: "Effect of sulfur-containing compounds on experimental diabetes.VI. Screening for hypo-glycemic action of sulfur-containing compounds", see page 200, abstract 111089w, Yakugaku Zasshi 1969, 89 (8), 1138-43 (Japan). & 8th Collective Index, vol. 66-75, 1967-1971 see pages 9455S and 32684S | 1-4 | X | Chemical Abstracts, vol. 99, no. 25, 19 December 1983, Columbus, Ohio (US) Kawai Koichi: "Effect of cysteamine on canine splanchnic D cells", see page 154, abstract 206966x, Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1983, 59(7) 962-72 (Japan). | 1-4 | X | Chemical Abstract, vol. 96, no. 7, 15 February 1982, Columbus, Ohio (US) H.P.T Ammon et al.: "Potentiation of the insulin-releasing capacity of tolbutamide by thiols: studies on the isolated perfused pancreas", see page 45, abstract 46096w, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1981, 317 (3) 262-7 (Eng.) | 1-4 | A | DE, A, 2835000 (SAARSTICKSTOFF-FATOL GmbH) 21 February 1980, see claim 1 | 1 | A | Unlisted Drugs, vol. 24, no. 5, May 1972, Chatham (N.J.) (US) see page 68:b | 1 |
| Category [*] | Citation of Document, ¹⁶ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷ | Relevant to Claim No. ¹⁸ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | Chemical Abstracts, vol. 71, no. 23, 8 December 1969, Columbus, Ohio (US) Chiba Takehisa: "Effect of sulfur-containing compounds on experimental diabetes.VI. Screening for hypo-glycemic action of sulfur-containing compounds", see page 200, abstract 111089w, Yakugaku Zasshi 1969, 89 (8), 1138-43 (Japan). & 8th Collective Index, vol. 66-75, 1967-1971 see pages 9455S and 32684S | 1-4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | Chemical Abstracts, vol. 99, no. 25, 19 December 1983, Columbus, Ohio (US) Kawai Koichi: "Effect of cysteamine on canine splanchnic D cells", see page 154, abstract 206966x, Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1983, 59(7) 962-72 (Japan). | 1-4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | Chemical Abstract, vol. 96, no. 7, 15 February 1982, Columbus, Ohio (US) H.P.T Ammon et al.: "Potentiation of the insulin-releasing capacity of tolbutamide by thiols: studies on the isolated perfused pancreas", see page 45, abstract 46096w, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1981, 317 (3) 262-7 (Eng.) | 1-4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | DE, A, 2835000 (SAARSTICKSTOFF-FATOL GmbH) 21 February 1980, see claim 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | Unlisted Drugs, vol. 24, no. 5, May 1972, Chatham (N.J.) (US) see page 68:b | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁵</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Date of the Actual Completion of the International Search ¹⁹</td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Date of Mailing of this International Search Report ²</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">19 March 1985 (19.03.85)</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">22 April 1985 (22.04.85)</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">International Searching Authority ¹</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Signature of Authorized Officer ²⁰</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">European Patent Office</td> <td></td> </tr> </table> | | | Date of the Actual Completion of the International Search ¹⁹ | Date of Mailing of this International Search Report ² | 19 March 1985 (19.03.85) | 22 April 1985 (22.04.85) | International Searching Authority ¹ | Signature of Authorized Officer ²⁰ | European Patent Office | | | | | | | | | | | |
| Date of the Actual Completion of the International Search ¹⁹ | Date of Mailing of this International Search Report ² | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 March 1985 (19.03.85) | 22 April 1985 (22.04.85) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| International Searching Authority ¹ | Signature of Authorized Officer ²⁰ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| European Patent Office | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO.

PCT/EP 84/00371 (SA 8518)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 04/04/85

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE-A- 2835000 | 21/02/80 | None | |

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 84/00371

| | | |
|--|---|---|
| I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben): Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Kl. ⁴ A 61 K 31/195; A 61 K 31/13 | | |
| II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff ⁴ | | |
| Klassifikationssystem | Klassifikationssymbole | |
| Int.Kl. ⁴ | A 61 K 31/00 | |
| Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁵ | | |
| III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ¹ | | |
| Art* | Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der Maßgeblichen Teile | Betr. Anspruch Nr. ² |
| X | Chemical Abstracts, Band 71, Nr. 23, 8. Dezember 1969, Columbus, Ohio (US) Chiba Takehisa: "Effect of sulfur- containing compounds on experimental diabetes. VI. Screening for hypo- glycemic action of sulfur-containing compounds", siehe Seite 200, Zusammenfassung 111089w, Yakugaku Zasshi 1969, 89(8), 1138-43 (Japan). & 8th Collective Index, Band 66-75, 1967-1971 siehe Seiten 9455S und 32684S -- | 1-4 |
| X | Chemical Abstracts, Band 99, Nr. 25, 19. Dezember 1983, Columbus, Ohio (US) Kawai Koichi: "Effect of cysteamine on canine splachnic D cells", siehe Seite 154, Zusammenfassung 206966x, | 1-4 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen³:</p> <p>A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div> | | |
| IV. BESCHEINIGUNG | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
| 19. März 1985 | | 22 AVR. 1985 |
| Internationale Recherchenbehörde | | Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten |
| EUROPÄISCHES PATENTAMT | | G.L.M. Knydenberg |

| III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (FOLGEND ZU SEITE 2) | | |
|---|---|------------------------------------|
| Art ¹⁶ | Bezeichnung der Veröffentlichung ¹⁷ soweit erforderlich unter Angabe der maßgebenden Teile ¹⁷ | Beitrag Anspruch Nr. ¹⁸ |
| | Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1983, 59/7) 962-72 (Japan). -- | |
| X | Chemical Abstracts, Band 96, Nr. 7, 15. Februar 1982, Columbus, Ohio (US) H.P.T. Ammon et al.: "Potentiation of the insulin-releasing capacity of tolbutamide by thiols: studies on the isolated perfused pancreas", siehe Seite 45, Zusammenfassung 46096w, Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 1981, 317(3) 262-7 (Eng). -- | 1-4 |
| A | DE, A, 2835000 (SAARSTICKSTOFF-FATOL GmbH) 21. Februar 1980, siehe Patentanspruch 1 -- | 1 |
| A | Unlisted Drugs, Band 24, Nr. 5, Mai 1972, Chatham (N.J.) (US) siehe Seite 68: b ----- | 1 |

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT UBER DIE

INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. PCT/EP 84/00371 (SA. 8518)

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben. Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 04/04/85

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| DE-A- 2835000 | 21/02/80 | Keine | |

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang :
siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)